

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-500313

(43) 公表日 平成10年(1998) 1月13日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 Q 1/68	Z N A	7823-4B	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/09		9282-4B	C 1 2 N 15/00 A

審査請求 有 予備審査請求 未請求(全 55 頁)

(21) 出願番号 特願平9-512781
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 9月12日
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 5月20日
(86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 1 4 6 4 8
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 1 1 1 9 6
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 3月27日
(31) 優先権主張番号 0 8 / 5 3 1 , 7 4 7
(32) 優先日 1995年9月21日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)
(31) 優先権主張番号 0 8 / 5 3 1 , 7 4 9
(32) 優先日 1995年9月21日
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ベクトン・ディッキンソン・アンド・カンパニー
アメリカ合衆国ニュージャージー州07417-1880, フランクリン・レイクス, ワン・ベクトン・ドライブ
(72) 発明者 ローマン, ケントン・エル
アメリカ合衆国カリフォルニア州95136, サン・ノゼ, ランフェア・サークル 540
(72) 発明者 オストレロバ, ナタリー・ブイ
アメリカ合衆国カリフォルニア州94040, マウンテン・ビュー, デル・メディオ・アベニュー 141, ナンバー116
(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 好熱性鎖置換増幅による細胞中の核酸の検出

(57) 【要約】

懸濁液中、スライド上または組織中の細胞における核酸標的配列の in situ 増幅のための好熱性鎖置換増幅 (t S D A) を記載する。優れた検体形態を保存し、そして DNA 標的か、RNA 標的かまたは両方を選択的に増幅させることができる。t S D A による in situ 増幅は、免疫化学的技術と適合しているので、標的配列の増幅および免疫学的染色の両方を同一検体で行うことができる。

FIG-1A HLA DNA 増幅

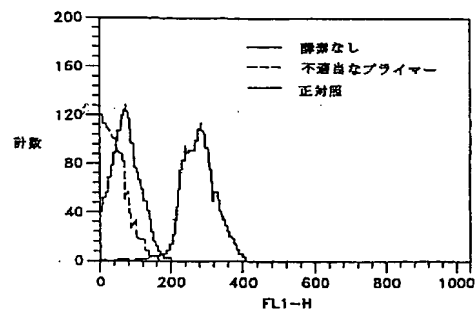
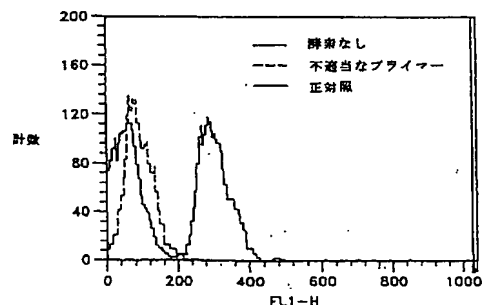


FIG-1B HIV DNA 増幅



BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 標的配列の *in situ* 増幅の方法であって、

(a) 細胞試料中において、第一増幅プライマーを標的配列の第一鎖に対して 3' に *in situ* でハイブリッド形成させ、該第一増幅プライマーは、第一標的結合配列に対して 5' に制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして第一外プライマーを該増幅プライマーの上流の標的配列の第一鎖に対してハイブリッド形成させ；

(b) 第一増幅プライマーおよび第一外プライマーを、

(i) 好熱性ポリメラーゼであって、約 50℃～75℃で活性であり、鎖置換活性を有し、そして 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いた上記好熱性ポリメラーゼ、

(ii) α-チオデオキシヌクレオシド三リン酸、および

(iii) 好熱性制限エンドヌクレアーゼであって、その制限エンドヌクレアーゼ認識部位が該 α-チオデオキシヌクレオシド三リン酸の包含によって半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼ認識部位にニックを入れる、約 50℃～75℃で活性である上記好熱性制限エンドヌクレアーゼの存在下において伸長させ、それによって、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む第一増幅プライマー伸長生成物を生成し、そして第一外プライマーの伸長によって標的配列の第一鎖から第一増幅プライマー伸長生成物を置換し；

(c) 第一相補鎖を合成することによって第一増幅プライマー伸長生成物および制限エンドヌクレアーゼ認識部位を二本鎖にし、それによって、二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れ；

(d) ポリメラーゼを用いてニックから伸長させ、それによって標的配列のコピーを二本鎖第一増幅プライマー伸長生成物から置換し；

(e) 標的配列が *in situ* 増幅されるように、ニックング、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

2. 二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に、Acc I、Bsl I、Bsm I、BsmA I、BsoB I、Bsr I、BsrD I、BstN I、BstO

I、B s t X IまたはM w o Iを用いてニックを入れる請求項1に記載の方法。

3. 好熱性ポリメラーゼが、*exo~V e n t*、*exo~D e e p V e n t*、B s t、*exo~P f u*、B c aおよび配列決定等級T a qから成る群より選択される請求項1に記載の方法。

4. 増幅した標的配列を検出することを更に含む請求項1に記載の方法。

5. 増幅した標的配列を *in situ* で検出する請求項4に記載の方法。

6. 増幅した標的配列をフローサイトメトリーによって検出する請求項5に記載の方法。

7. 増幅した標的配列を顕微鏡検査法によって検出する請求項5に記載の方法。

8. 増幅した標的配列を、増幅中の標的配列上のシグナルプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長によって生じた第二増幅生成物によって検出する請求項5に記載の方法。

9. 標的配列が二本鎖であり、

(a) 第二増幅プライマーを標的配列の第二鎖に対して3'に *in situ* でハイブリッド形成させ、該第二増幅プライマーは、第二標的結合配列に対して5'に制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして第二外プライマーを該増幅プライマーの上流の標的配列に対してハイブリッド形成させ；

(c) 第二増幅プライマーおよび第二外プライマーを伸長させ、それによって、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む第二増幅プライマー伸長生成物を生成し、そして第二外プライマーの伸長によって標的配列の第二鎖から第二増幅プライマー伸長生成物を置換し；

(d) 第二相補鎖を合成することによって第二増幅プライマー伸長生成物および制限エンドヌクレアーゼ認識部位を二本鎖にし、それによって、二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れ；

(e) ポリメラーゼを用いてニックから伸長させ、それによって標的配列のコピーを二本鎖第二増幅プライマー伸長生成物から置換し；そして

(f) 標的配列が *in situ* 増幅されるように、ニックング、伸長および置換の工程を繰返す工程を更に含む請求項1に記載の方法。

10. 二本鎖HIV gag標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：1の標的結合配列を含む第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ、そして配列番号：2の標的結合配列を含む第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマーをポリメラーゼによって伸長させて、第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 第一および第二増幅プライマー伸長生成物を標的配列から置換し；そして

(d) 標的配列が増幅されるように、ハイブリッド形成、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

11. 第一および第二増幅プライマーがそれぞれ、 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の包含によって制限エンドヌクレアーゼ認識部位が半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れられる制限エンドヌクレアーゼの認識部位であって、標的結合配列に対して5'である制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして

(a) 外プライマーが、第一および第二増幅プライマーの上流の標的配列に対してハイブリッド形成し；そして

(b) 第一増幅プライマー、第二増幅プライマーおよび外プライマーが、制限エンドヌクレアーゼおよび α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下において伸長して、外プライマーの伸長によって標的配列から置換される第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成する請求項10に記載の方法。

12. 二本鎖標的配列をポリメラーゼ連鎖反応で増幅させる請求項10に記載の方法。

13. 二本鎖HIV gag標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：1から成る第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ且つ配列番号：2から成る第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ、そして第一および第二増幅プライマーの上流に外プライマーをハイブリッ

ド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマー並びに外プライマーを、鎖置換活性を有する5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼであって、約50℃～75℃で活性であるポリメラーゼ、 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸およびBsoBIの存在下において伸長させ、それによって、外プライマーの伸長によって標的配列の第一および第二鎖から置換されるBsoBI認識部位を含む第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 相補鎖を合成することによって第一および第二増幅プライマー伸長生成物およびBsoBI認識部位を二本鎖にし、それによって、二本鎖BsoBI認識部位にBsoBIによってニックを入れ；

(d) ポリメラーゼを用いてニックから伸長させ、それによって標的配列のコピーを二本鎖第一および第二増幅プライマー伸長生成物から置換し；そして

(e) 標的配列が増幅されるように、ニックング、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

14. 増幅した標的配列を、配列番号：5、配列番号11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14を用いて検出することを更に含む請求項13に記載の方法。

15. 二本鎖HLA-DQ α エクソン3標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：6の標的結合配列を含む第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3' にハイブリッド形成させ、そして配列番号：7の標的結合配列を含む第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3' にハイブリッド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマーをポリメラーゼによって伸長させて、第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 第一および第二増幅プライマー伸長生成物を標的配列から置換し；そして

(d) 標的配列が増幅されるように、ハイブリッド形成、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

16. 第一および第二増幅プライマーがそれぞれ、 α -チオデオキシヌクレオ

シド三リン酸の包含によって制限エンドヌクレアーゼ認識部位が半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れられる制限エンドヌクレアーゼの認識部位であって、標的結合配列に対して5'である制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして

(a) 外プライマーが、第一および第二増幅プライマーの上流の標的配列に対してハイブリッド形成し；そして

(b) 第一増幅プライマー、第二増幅プライマーおよび外プライマーが、制限エンドヌクレアーゼおよび α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下において伸長して、外プライマーの伸長によって標的配列から置換される第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成する請求項15に記載の方法。

17. 標的配列をポリメラーゼ連鎖反応で増幅させる請求項15に記載の方法。

18. 二本鎖HLA-DQ α エクソン3標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：6から成る第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ且つ配列番号：7から成る第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ、そして第一および第二増幅プライマーの上流に外プライマーをハイブリッド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマー並びに外プライマーを、鎖置換活性を有する5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損ポリメラーゼであって約50℃～75℃で活性であるポリメラーゼ、 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸およびBsoBIの存在下において伸長させ、それによって、外プライマーの伸長によって標的配列の第一および第二鎖から置換されるBsoBI認識部位を含む第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 相補鎖を合成することによって第一および第二増幅プライマー伸長生成物およびBsoBI認識部位を二本鎖にし、それによって、二本鎖BsoBI認識部位にBsoBIによってニックを入れ；

(d) ポリメラーゼを用いてニックから伸長させ、それによって標的配列のコピーを二本鎖第一および第二増幅プライマー伸長生成物から置換し；そして

(e) 標的配列が増幅されるように、ニッキング、伸長および置換の工程を繰

返す工程を含む上記方法。

19. 配列番号：1の標的結合配列、配列番号：2の標的結合配列、配列番号：6の標的結合配列または配列番号：7の標的結合配列を含むオリゴヌクレオチド。

20. 配列番号：5、配列番号：10、配列番号：11、配列番号：12、配列番号：13または配列番号：14から成るオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

好熱性鎖置換増幅による細胞中の核酸の検出

発明の分野

本発明は、核酸の増幅、特に、形態学的に完全な細胞中の核酸の増幅に関する。

発明の背景

核酸増幅技術は、少量の核酸の検出および分析のための強力な手段を提供してきた。このような方法の極端な感度は、伝染病および遺伝病の初期診断、分析用の遺伝子の単離、並びに法医学における特定の核酸の検出のためにそれらを開発する試みをもたらししてきた。核酸増幅技術は、その手順の温度要求条件にしたがって分類されうる。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）および転写に基く増幅は、増幅用に一本鎖標的分子を再生するのに、高温（85℃～100℃）～低温（30℃～40℃）の反応の反復循環を必要とする。対照的に、鎖置換増幅（SDA）、自己持続配列複製（SSR）およびQ β レプリカーゼシステムなどの方法は、一定温度で行うことができる等温反応である。

PCRにおいて、反応温度は、プライマー伸長後に上昇して、新たに合成された鎖を鋳型から分離する。次に、温度を低下させてプライマーを再アニーリングし且つ伸長過程を繰返す。したがって、PCR反応工程は、反応の温度束縛の結果として、不連続の相またはサイクルで起こる。対照的に、鎖置換増幅（SDA）では、プライマーの伸長、一本鎖伸長生成物の置換、伸長生成物（または元の標的配列）に対するプライマーのアニーリング、および引き続きのプライマーの伸長は、反応配合物中で同時に起こる。従来のSDA（より低温で、通常は約35～45℃で行われる）は、G.T.ウォーカー（Walker）ら（1992a.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89,392-396 および 1992b.Nuc.Acids.Res.20,1691-1696）によって記載されている。SDA反応の好熱性変法（tSDA、以下に記載）が最近になって開発されており、それは、熱安定ポリメラーゼおよび制限エンドヌクレアーゼを用いて、より高いがなお一定の温度で行われる。

SDAによる増幅の標的は、SDA反応で用いられるエンドヌクレアーゼを用

いて、より大きい核酸をフラグメント化することによって製造することができる。しかしながら、標的が、フラグメント化に必要な制限エンドヌクレアーゼ認識部位に隣接していない場合、S D Aにおいてニッキングするのに適当な制限エンドヌクレアーゼ認識部位を有する標的核酸は、ウォーカーら (1992b, 上記) および米国特許第5,270,184号明細書で記載されたように生じることができる。S D Aの場合と同様、標的生成反応の個々の工程は、同時に且つ連続的に起こり、S D Aにおいて制限酵素によってニッキングするのに必要な末端認識配列を含む標的配列を生じる。S D A反応の成分全部が標的生成反応中に存在するので、生成された標的配列は自動的に且つ連続的にS D Aサイクルに入り且つ増幅される。

in situ 核酸分析法は、形態学的に完全な細胞中の特定の核酸配列の検出および局在化を可能にする。これらの方法は、例えば、米国特許第4,888,278号明細書で記載のように、標識されたプローブの直接ハイブリダイゼーションに基いて慣用的に用いられてきた。しかしながら、このような直接ハイブリダイゼーション法は、目的の核酸に特異的であるが、いずれの場合にも、極めて低いコピー数の核酸を検出するほど十分に感受性でなくてよい。極めて低いコピー数を検出する手段としては、*in situ* 検出前の標的配列の *in situ* 増幅が極めて興味深かった。*in situ* 核酸増幅法は、細胞が増幅生成物を濃縮するので従来の溶液増幅よりも感受性である可能性があり、したがって、増幅生成物が自由に拡散する場合またはそれらが、目的の配列を含まない細胞内容物によって希釈される場合に可能であるよりも少ない分子の検出を可能にする。核酸は、標的配列の検出前に細胞から抽出される必要がないので、*in situ* 法は、集団中のどの細胞が特定の核酸を含んでいるかに関する情報を提供し且つ細胞の生化学的および形態学的特性に関しての核酸の分析を更に可能にする。*in situ* 増幅法は、主としてP C Rについて開発されてきた (O. バスガラ (Basgara) およびR. ポメラantz (Pomerantz) , 1993年, AIDS Research and Human Retroviruses 9(1),69-76; G. ヌオボ (Nuovo) ら、1992年, Diag.Molec.Pathol.1(2),98-102; M.J.エンブレトン (Embleton) ら、1992年, Nuc.Acids Res.20(15),3831-3837; J. エメトソン (emmetson) ら、1993年, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90,357-361; P. コミノス

(Korminoth) ら、1992年、Diag.Molec.Phato1.1(2),85-97; K.P.チル (Chile)

ら、1992年、J.Histochem.Cytochem.40(3),333-341; ハーゼ (Haase) ら、1990年、Proc.Natl.Acad.Sci.USA87,4971-4975; O. バスガラら、1992年、New Engl.J.Med.326(21),1385-1391; パターソン (Patterson) ら、1993年、Science 260,976-979)。しかしながら、加熱および冷却の多サイクル、並びにPCRによってその感受性を達成するのに必要な緊縮ハイブリダイゼーション条件は、組織および細胞によって十分に耐えられない。増幅した配列の細胞外への拡散は、繰返し加熱によって増加して、試料中の拡散シグナルを増加させることができる。細胞からのPCR生成物の減損を減少させようと試みて、しばしば、架橋固定液による長時間の固定(15時間～何時間か)を、PCRによる *in situ* 増幅に用いる。この処理は、しばしば、増幅の前に固定細胞のプロテアーゼ処理を必要とする(G. ヌオボら、1992年、Diag.Molec.Pathol.1(2),98-102)。

in situ で行われる従来の低温SDAは、(1)細胞識別のための免疫表現型決定を可能にする細胞構造の向上した維持および(2)細胞中のアンプリコンの有意に向上した保持を含めた *in situ* PCRにまさる多数の利点を有することが判った。しかしながら、*in situ* tSDAの増加した温度がこれらの特徴に対してどんな作用を有するかは不明であった。温度の増加(概して、従来のSDAと比較して約15～20℃)は、増加した反応特異性および速度の利点を与えることがあったが、おそらくは、正確な免疫表現型決定および細胞識別を妨害するまたは妨げるであろう水準まで、細胞破壊を有意に増加させることもあった。反応温度の顕著な増加はまた、細胞外へのアンプリコンの拡散を増加させることがあり、そこでそれらは負の細胞によって取込まれ且つ偽陽性シグナルを生じることがあった。しかしながら、意外にも、*in situ* tSDA後の細胞構造は、フローサイトメトリーでの正常な前方および側方光散乱性によって実証されるようにほぼ完全な状態のままであることが判った。したがって、免疫表現型決定は、*in situ* tSDAの温度およびプロトコルと適合する。出願人は、より高い温度での細胞の維持が、PCRの場合のように加熱および冷却の反復サイクルを細胞に施すよりも損傷が少ないことがありうると仮定している。意外にも、アンプリコン

の拡散はほとんど増加しなかったことも発見されたが、それは、細胞が、熱サイクルを施された場合よりも高い一定温度で維持された場合にほとんど損傷されない

いことがありうるためであると考えられる。

以下の用語を本明細書中において下記の通り定義する。

増幅プライマーは、プライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長による標的配列の増幅のためのプライマーである。S D A に対して、増幅プライマーの3'末端は、標的配列の3'末端でハイブリッド形成する標的結合配列である。増幅プライマーは、更に、その標的結合配列に対して5'に、概して、その5'末端付近に制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含む。制限エンドヌクレアーゼ認識部位は、その認識部位がウォーカーら (1992a)、上記によって記載のように半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼの二本鎖認識部位にニックを入れるであろう制限エンドヌクレアーゼによって認識されるヌクレオチド配列である。半修飾された認識部位は、制限エンドヌクレアーゼの二本鎖認識部位であり、ここにおいて、一方の鎖は、二重らせんの鎖の一方が制限エンドヌクレアーゼによって切断されるのを妨げる少なくとも一つの誘導体化されたヌクレオチドを含む。「ニッキング」とは、典型的な二本鎖切断とは対照的に、二重らせんの一方の鎖だけが制限エンドヌクレアーゼによって切断されるこの修飾された活性を意味する。制限エンドヌクレアーゼによってニッキング可能である半修飾制限エンドヌクレアーゼ認識部位はいずれも、S D A において用いるのに適している。S D A のための増幅プライマーは、ウォーカーら (1992b)、上記によってS₁およびS₂と称される。 α -チオ修飾デオキシリボヌクレオシド三リン酸を、「d N T P α S」、「d A T P α S」、「d C T P α S」等と略記する。

「バンパー」すなわち外プライマーは、増幅プライマーの上流の標的配列に対してアニーリングするプライマーであるので、外プライマーの伸長は下流のプライマーおよびその伸長生成物を置換する、すなわち、増幅プライマーによって与えられた制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む標的配列のコピーは置換される。バンパープライマーは、したがって、標的結合配列だけから成り、そしてそれらが増幅プライマーの上流にアニーリングし且つ伸長された場合にそれらを置換

するように設計される。外プライマーは、ウォーカーら (1992b)、上記によってB₁およびB₂と称される。外プライマーの伸長は、増幅プライマーの伸長生成物を置換する一つの方法であるが、若干の場合、加熱もまた適当でありうる。

標的または標的配列という用語は、増幅される核酸配列 (DNAおよび/またはRNA) を意味する。これらには、増幅される元の核酸配列およびその相補的第二鎖並びに標的配列の増幅によって生成された元の標的配列のコピーのどちらかの鎖が含まれる。

増幅生成物、伸長生成物またはアンプリコンは、標的配列の増幅の際に生成された標的配列のコピーを含むオリゴまたはポリヌクレオチドである。

発明の概要

好熱性鎖置換増幅 (t SDA) は、懸濁液中、スライド上または組織中の細胞における核酸標的配列の *in situ* 増幅に対して、従来の *in situ* SDA より優れた速度、感度および特異性によって適応してきた。優れた検体形態は、フローサイトメトリーでの正常な光散乱パラメーターによって実証されるように、従来の *in situ* SDA より有意に高い温度に対する暴露にもかかわらず保存される。t SDA による *in situ* 増幅はまた、増加した反応温度にもかかわらず免疫化学的技術となお適合しているので、標的配列の増幅および免疫学的染色の両方を同一検体で行うことができる。これは、反復温度循環が目的の細胞性抗原を免疫化学的技術によって検出不能にすることがある *in situ* PCR とは対照的である。

in situ t SDA のための本発明の方法は、概して、細胞または組織の簡単な固定に続いて、透過性付与および t SDA に必要な試薬の添加を含む。標的配列がDNAである場合、細胞または組織を、増幅前に簡単に加熱して標的配列を変性させる。関与した酵素の熱安定性ゆえに、加熱は、場合により、酵素を含む試薬の混合物中で起こりうる。或いは、変性後、試料を所望の反応温度まで冷却するときに酵素を加えることができる。t SDA 反応は、典型的に、55～65℃で1分間～2時間インキュベートされるが、選択された酵素に適合しうるならば、更に高い温度も可能である。標的配列を変性させるのに前加熱が必要とされな

い場合、SDA反応成分全部を、固定され、透過性付与された細胞に対して直接的に、増幅を開始する所望の反応温度で単純に加える。用いられなかったプライマーおよび酵素を洗浄除去した後、増幅生成物を *in situ* でまたは細胞から放出後に検出する。

図面の簡単な説明

図1は、*in situ* tSDAによるHIV標的配列およびHLA-DQ α エクソン3標的配列の増幅に関するフローサイトメトリーの結果を示す。

発明の詳細な説明

tSDAによる *in situ* 核酸増幅のための本発明の方法は、*in situ* tSDAが、細胞構造および形態をほとんど損なうことなく、*in vitro* (溶液) tSDAプロトコルの有意に向上した感度、速度および特異性を提供するという発見に基く。概して、核酸標的配列を含有すると疑われる細胞の試料（例えば、懸濁液中の細胞または組織切片）は、細胞の形態学的完全性を維持するが細胞タンパク質を架橋しないまたは沈殿させない固定液によって固定され、その結果十分に、プライマーおよび他の試薬の浸透が妨げられる。したがって、固定された細胞中へのプライマーおよび試薬の浸透を達成するための固定後のプロテアーゼによる処理は、概して、必要とされない。

架橋性かまたは沈殿性固定液を、本発明の実施において用いることができる。例としては、パラホルムアルデヒド、4%グルタルアルデヒド、エタノール/酢酸固定液、カルノワ固定液（酢酸、エタノール、クロロホルム）、1%四酸化オスミウム、ブワン固定液（1.21%ピクリン酸、11%ホルムアルデヒド、5.6%酢酸）、ツェンカー固定液（5.0%塩化水銀、2.5%二塩素酸カリウム、5.0%酢酸、1.0%硫酸ナトリウム）、および酢酸/メタノール固定液がある。FACS™ 溶解液 (Lysing Solution) の使用は、溶解、固定および透過性付与を一つの試薬を用いて可能にする。本発明において用いるのに好ましい固定液は1~4%パラホルムアルデヒドであり、好ましくは、それを用いて細胞または組織を約1分間~1時間処理する。概して、固定された細胞を、増幅の前に、例えば、NP40、TRITON またはサポニンなどの洗剤を用いて透過性にすることは

有用である。若干の状況下において、固定は任意であってよい。すなわち、t S D A は、特に、R N A 標的が選択的に増幅される場合に非固定細胞中において i n situ で行われうるし且つ予備的熱変性工程を必要としない（以下を参照されたい）。

本発明の重要な特徴は、R N A かまたは D N A 標的配列、または両方を、本発明の方法を用いて直接的に増幅させることができるということである。R N A だけを増幅させるために、逆転写酵素を t S D A 反応に対して、それが逆転写 P C R (r t P C R - G. J. ヌオボラ、1992年、Diag. Molec. Pathol. 1, 98-102; G. J. ヌオボラ、1991年、Am. J. Pathol. 58, 518-523; G. J. ヌオボラ、1991年、Am. J. Pathol. 139, 1239-1244) であるように加えることができる。しかしながら、t S D A で用いられる D N A ポリメラーゼのいくつかは、現在、逆転写酵素活性を示すことが判っている。それらは、R N A かまたは D N A を鋳型として用いて、d N T P α S の包含およびニックからの置換を伴って、標的配列の D N A コピーを重合させることができる。R N A 標的配列は、したがって、別の逆転写酵素を加えることを必要とすることなく、t S D A 反応の D N A 増幅部分を行う同一ポリメラーゼによって逆転写されうる。R N A は、熱変性工程を省くことによってかまたは t S D A 反応を開始する前に D N アーゼによって処理することによって細胞中で（すなわち、D N A 標的の増幅をほとんど伴うことなく）増幅されうる。次に、細胞中の二本鎖 D N A は依然として二本鎖で且つ鋳型として利用できないままであるが、プライマーは、利用可能な一本鎖 R N A に対してハイブリッド形成することができるし且つ c D N A を生じることによって R N A 標的配列の特異的増幅を開始することができる。c D N A は、順次に、更に増幅するための鋳型として役立つ。R N A 標的配列の特異的増幅はまた、S D A を開始する前に R N アーゼ不含 D N アーゼによって細胞を処理することによって達成されうる。固定は加熱中の細胞の完全性の維持を助けるので、予備的熱変性工程が存在しない場合、固定を必要としなくてよい。しかしながら、非固定細胞または組織を透過性にすることはなお有用でありうる。

二本鎖 D N A の熱変性の前の R N アーゼによる細胞または組織の処理は、潜在

的RNA標的配列を分解し且つ対応するDNA標的配列の特異的増幅を可能にする。NaOH（約0.1M）もまた、DNA特異的増幅のために選択的にRNAを分解し且つDNAを変性させるのに用いることができる。

熱変性工程が、SDAプライマーのアニールングの前に（RNAアーゼ処理を伴うことなく）含まれる場合、DNAおよびRNA両方の標的配列が増幅されるであろう。tSDAで用いられるDNAポリメラーゼによるRNAの *in situ* 逆

転写は、概して、DNA合成よりも有効ではないが、意外にも、若干の場合において従来の逆転写酵素よりも有効であることが判った。しかしながら、RNA標的は、通常、対応するDNA標的よりも多数で細胞中に存在し、そして速やかに生じるcDNAの増幅の高性能は、反応の逆転写工程におけるどんな低下した効率も克服し且つ補う。RNAおよびDNA標的両方の増幅は、これが細胞当りの増幅可能な標的配列の最大数を与え、そしてその結果として、試料当りの潜在的に正の細胞の最大の感度および最大数を与えるので、本発明の大部分の診断的用途に好ましい。

標的を増幅の前に熱変性させる場合、固定細胞または組織を、SDA反応混合物（例えば、dNTP、 K_2PO_4 、 $MgCl_2$ 、BSA、DMSO、外プライマー、増幅プライマー、および十分に熱安定性である場合の酵素）中で加熱することができる。ポリメラーゼおよび制限エンドヌクレアーゼが変性温度で十分に熱安定性でない場合、試料を所望の反応温度まで冷却した後にそれらを加えることができる。標的が熱変性されない場合、制限エンドヌクレアーゼおよび1種類または複数のポリメラーゼを含めたSDA反応混合物を細胞試料に対して増幅を開始するように選択された反応温度で単純に加えることができる。

従来のSDAに対するのと同様に、tSDAによる増幅のための標的は、標的配列を切断しないエンドヌクレアーゼによる制限によってより大きな核酸をフラグメント化することにより製造することができる。しかしながら、*in situ* tSDAおよび従来の *in situ* SDA両方に対して、概して、増幅反応でニッキングするための選択された制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位を有する標的核酸をウォーカーら（1992年，Nuc.Acids Res.，上記）および米国特許第5,270,18

4号明細書で記載のように生じさせることは好ましい。

一つのSDA反応が別の反応の増幅生成物によって交差汚染されるのを防止するために、増幅反応を有意に阻害することなく、dUTPをdTTPの代わりにSDAアンプリコン中に包含させることができる。次に、ウラシル含有核酸を、UDG（ウラシルDNAグリコシラーゼ）による処理によって特異的に認識し且つ失活させることができる。したがって、dUTPが反応の前にSDAアンプリコン中に包含される場合、引き続きのSDA反応はいずれも、二本鎖標的の増幅

の前にUDGによって処理することができるし、そして前に増幅された反応からのdU含有DNAはいずれも増幅不能になるであろう。引き続きの反応で増幅される標的DNAは、dUを含まないし、そしてUDG処理によって影響されないであろう。次に、UDGを、標的の増幅の前にUgi（ウラシルDNAグリコシラーゼ阻害剤）による処理によって阻害することができる。或いは、UDGは熱失活されうる。tSDAでは、反応自体の更に高い温度（ $\geq 50^{\circ}\text{C}$ ）を用いて、同時にUDGを失活させ且つ標的を増幅させることができる。

SDAは、 $5' \rightarrow 3'$ エキソヌクレアーゼ活性を欠き、二本鎖核酸中の一本鎖ニックで重合を開始し、そしてそのニックの下流の鎖を置換すると同時に、非ニック鎖を鋳型として用いて新しい相補鎖を生じるポリメラーゼを必要とする。ポリメラーゼ置換活性は、標的を更に別のコピーの合成に利用可能にするし且つ第二増幅プライマーが指数的増幅反応でハイブリッド形成しうる一本鎖伸長生成物を生じるので、それは増幅反応にとって不可欠である。より進行的ポリメラーゼは、増幅されうる標的配列の長さを最大限にすることができるので、それらは好ましい。

従来、tSDAに適當であると考えられる温度での好熱性ポリメラーゼの活性についてはほとんど知られていない。更に、好熱性制限エンドヌクレアーゼの活性と適合しうる温度での好熱性ポリメラーゼの活性は知られていなかった。したがって、スクリーニング検定は、存在する場合の候補制限エンドヌクレアーゼおよびポリメラーゼを識別するために開発された。ポリメラーゼスクリーニングシステムは、二本鎖鋳型中の一本鎖ニックで開始する下流の鎖を置換するポリメラ

ーゼの能力を試験する伸長検定である。それは、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性の存在または不存在についても調べる。5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性は、他に適当な好熱性ポリメラーゼ中に存在する場合、当該技術分野において知られている常套法によって失活させることができる (WO 92/06200号)。ポリメラーゼ中のエキソヌクレアーゼ活性を選択的に失活させる最も一般的な方法の一つは、ポリメラーゼの遺伝子をクローン化し、エキソヌクレアーゼ活性に関与するタンパク質ドメインをコードする遺伝子配列の部分を識別し、そしてそれを *in vitro* 突然変異誘発によって失活させることである。或いは、エキソヌクレア

ーゼ活性は、ポリメラーゼをプロテアーゼによって処理して、所望の重合および置換活性だけを示すフラグメントを単離することによって失活させることができる。したがって、伸長検定で識別された好熱性ポリメラーゼは、適当な温度で活性であり、ニックで伸長を開始し、そして修飾された d N T P を包含するが 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有していて、エキソヌクレアーゼ活性の削除によって S D A に適するようにすることができる。

ポリメラーゼに関する伸長検定において、二本鎖核酸からの一本鎖の置換およびニックでの開始は、互いに直ぐ隣の二つのプライマーを両方のプライマーに対して相補的な完全な配列上でアニーリングすることによって行われる。プライマーは、それらの 5' 末端に、通常は³²Pによって標識される。ポリメラーゼが鎖置換活性を有し、隣接するハイブリッド形成したプライマーによって形成された「ニック」で重合を開始することができ、そして 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いている場合、両方のプライマーは伸長し、そして二つの伸長生成物が検出されるであろう。ポリメラーゼが 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠いているがニックで伸長を開始できない (例えば、それがギャップを必要とする) 場合および/またはそれが置換活性を欠いている場合、下流プライマーの伸長生成物だけが検出されるであろう。ニックで開始するが 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼは、上流プライマーの伸長生成物だけを生成するであろう。伸長検定はまた、反応中に含まれる α-チオ d N T P (d N T P α S) をポリメラーゼが包含することができることを必要とする。上流および下流プラ

イマー並びにそれらのそれぞれの伸長生成物は、概して、オートラジオグラフィによってゲル上において寸法で識別される。

伸長検定で最初にスクリーニングされた11種類の好熱性DNAポリメラーゼの内6種類、すなわち、*exo~Vent* (ニュー・イングランド・バイオラプズ (New England Biolabs))、*exo~Deep Vent* (ニュー・イングランド・バイオラプズ)、*Bst* (バイオラド (BioRad))、*exo~Pfu* (ストラタジーン (Stratagene))、*Bca* (パンベラ (Panvera)) および配列決定等級*Taq* (プロメガ (Promega)) は、本発明で用いるのに必要な特性を全部有すると確認された。他は、本発明の技術を用いることなく前述の伸長検定を用いて常套

手段によって識別することができ、そしてこのようなポリメラーゼはいずれも、*tSDA*で用いるのに適当であろう。ポリメラーゼ*Tth* (ベーリンガー (Boehringer))、*Tfl* (エピセントル (Epicentre))、*REPLINASE* (デュボン (Du Pont)) および *REPLITHERM* (エピセントル) は、ニックから鎖置換するが、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性も有する。これらのポリメラーゼは、例えば、遺伝子工学によってエキソヌクレアーゼ活性を除去後に、本発明の方法において有用である。これまでに識別された好熱性ポリメラーゼの大部分は、約50℃~75℃で活性であり、約65℃~75℃で最適活性であり、そして約50℃~65℃で低活性である。しかしながら、好熱性制限エンドヌクレアーゼの熱安定性は、概して、65℃未満に限定されるので、より低温で最適活性を有する好熱性ポリメラーゼ (例えば、*Bst* および *Bca*) は、反応において好熱性制限エンドヌクレアーゼと一層適合し、したがって、好ましい。しかしながら、ポリメラーゼ活性の通常最適温度と適合しうる更に高い温度で活性である制限エンドヌクレアーゼを識別することができ、そしてそれもまた本発明で有用である。

*SDA*に適した制限エンドヌクレアーゼは、その制限エンドヌクレアーゼの二本鎖の半修飾された認識/切断部位の鎖の一方だけを切断する必要がある (「ニックング」)。このニックング活性は、ニックングが反応を永久化し且つ標的増幅の次のサイクルを開始させるので極めて重要である。制限酵素は、概して、二本鎖切れ目を生じるので、二重らせん切断部位における二つの鎖の一方の切断は

選択的に阻害される必要がある。これは、通常、修飾鎖かまたは非修飾鎖が切断に対しては感受性でないように、合成の際のDNAの一方の鎖中にヌクレオチド類似体（例えば、デオキシヌクレオシドホスホロチオエート）を導入することによって達成される。非修飾鎖が切断から保護される場合、ヌクレオチド類似体は、その合成の際にプライマー中に包含されることができ、したがって、増幅反応に対してヌクレオチド類似体を加える必要も、ポリメラーゼがこのようなヌクレオチド類似体を包含することができるという必要条件も排除される。

ヌクレオチド類似体置換は、いずれの制限エンドヌクレアーゼによってもニッキングを引き起こさないの、制限エンドヌクレアーゼのニッキング特性を検定する手段は、多数の利用可能な好熱性制限エンドヌクレアーゼの中に存在するか

もしれない適当な酵素を識別するために必要とされた。したがって、所望の性質を有する好熱性制限エンドヌクレアーゼを識別するためのスクリーニングシステムは、二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位の一方の鎖中に包含された修飾デオキシヌクレオチドが該エンドヌクレアーゼによる切断から二つの鎖の一方を保護するその能力に基いて考案された。これを、類似体誘導ニッキング検定または鎖保護検定と称する。

鎖保護検定において、制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位を含む一本鎖鋳型およびその認識／切断部位以外の鋳型の一部分に対して相補的なプライマーを合成する。次に、その鋳型およびプライマーを、典型的には放射性標識によって標識する。プライマーおよび鋳型をハイブリッド形成させ、そして修飾されたdNTPをプライマーの伸長によって包含して、半修飾された制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位を含有する完全に二本鎖の分子を生じる。この生成物を、二本鎖の切断に適当な条件下において制限エンドヌクレアーゼによって処理する。変性条件下での反応生成物の電気泳動分析を用いて、生じたフラグメントの寸法により、認識／切断部位がニックを入れられたか、切断されたかまたは切断されなかったか否かを確認する。電気泳動でのフラグメントの寸法は、認識／切断部位の二つの鎖（すなわち、修飾または非修飾）のどちらが切断から保護されたかを決定するのに用いられる。鎖保護検定は、常套手段によって、本発明の技術

を用いることなく、本発明での用途のための更に別の制限エンドヌクレアーゼをスクリーニングするのに適応しうる。

鎖保護検定を用いて、28種類の好熱性制限エンドヌクレアーゼを試験した (Acc I、Asp I、Bsa I、BsaBI、BsiYI、Bsl I、Bsm Iの二つの縮重部位、BsmAI、BsmFI、BsmHI、BspWI、BsoBIの四つの縮重部位、BsoFI、Bsr Iの二つの縮重部位、BsrBRI、BsrDIの二つの縮重部位、Bst71I、BstNIの二つの縮重部位、BstOI、BstXI、DpnI、HaeII、MamI、MboII、MvaI、MwoI、SfiIおよびTth111I)。28種類の内11種類、すなわち、Acc I、Bsl I、Bsm I、BsmAI、BsoBI、Bsr I、BsrDI、BstNI、BstOI、BstXIおよびMwoIは、少なくとも

も一つの α -チオdNTPの導入の際にニックを入れられた少なくとも一つの制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位を有した。Bsm Iの認識部位の一つは、dCTP α Sが含まれた場合に非修飾鎖の保護を示した。50~65℃での熱安定性について試験された場合、11種類の内一つ (Acc I) を除く全部が十分に安定であったかまたは二本鎖DNA若しくはBSAなどの一般的な安定剤の添加によって十分に安定化されることができた。したがって、これらのエンドヌクレアーゼは、tSDA反応において好熱性ポリメラーゼと適合した。

更に、鎖保護検定の初期スクリーニング条件下で部分または低ニック活性を有したいくつかの好熱性エンドヌクレアーゼを識別した (例えば、Tth111I、BsiYIおよびBsoFI)。低下したニック活性がSDAを妨げることはなかったが、制限エンドヌクレアーゼによるニックは、反応条件を調整することによって (例えば、緩衝液を最適化するかまたは反応温度を調整することによって) 最適化されて、それらの条件をtSDAにおいて一層有効にすることができる。更に、制限エンドヌクレアーゼ認識/切断部位に隣接する配列は、エンドヌクレアーゼ活性の程度に影響を与えることがあるということは知られているので、鋳型の隣接配列の変更は、部分的にしかニックを入れられなかったエンドヌクレアーゼのニック活性を更に向上させることができる。

好熱性SDAは、所望の熱安定ポリメラーゼおよび熱安定制限エンドヌクレアーゼの置換を伴って、本質的には従来のSDAと同様に行われる。当然ながら、反応温度は、選択された好熱性酵素に適したより高温に調整されるであろうし、そして慣用的な制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位は、選択された熱安定エンドヌクレアーゼに適切な制限エンドヌクレアーゼ認識／切断部位によって置き換えられるであろう。更に、従来のSDAとは対照的に、実施者は、初期熱変性工程の前に、その温度で酵素が十分に安定である場合、酵素を反応混合物中に含めることができる。tSDAで用いるのに好ましい制限エンドヌクレアーゼは、BsrI、BstNI、BsmAI、BslIおよびBsoBI（ニュー・イングランド・バイラズ）並びにBstOI（プロメガ）である。好ましい好熱性ポリメラーゼは、BcaおよびBstである。

高増幅因子（例えば、 $10^8 \sim 10^9$ ）が可能な最適なSDAシステムを開発するために、緩衝液システムの評価および最適化が勧められる。これは、好熱性SDAで用いるための新規な制限酵素／ポリメラーゼ対合を評価する場合でもある。このような最適化法は、tSDAのための任意の制限エンドヌクレアーゼ／ポリメラーゼ組合わせに適切な緩衝液を決定するのに応用することができ、本発明の技術を用いることなく慣例的な試験のみを必要とする。大部分の場合、従来のSDAで典型的に用いられる $KPO_4/MgCl_2$ 緩衝液がtSDAに適しており、記載の通りかまたは成分濃度の若干の慣例的変更を伴う。

in situ tSDAでは、増幅のための試薬を、非固定細胞または上記のように固定され且つ透過性にされた細胞に対して適用する。反応の開始後、標的配列の増幅を、概して、約 $50 \sim 65^\circ C$ で1分間～2時間、好ましくは、10分間～1時間進行させる。tSDAまたは従来のSDAによるin situ 増幅に必要な時間は、PCRによって同様の水準の標的in situ 増幅を得るのに必要な時間よりも有意に少ないことが判っている。若干の場合、in situ tSDAのための試薬（特に、プライマー）の濃度をin vitro tSDAと比較して増加させて、有効な増幅のために十分な量が細胞に入るのを確実にすることは好都合でありうる。細胞からのアンプリコンの漏出は、若干のin situ 核酸増幅法において問題

であった。このような漏出は、種々のパラメーター、例えば、アンプリコンの寸法、温度、温度循環、および細胞が透過性にされた程度の複雑な相互作用の結果であると考えられる。細胞中のアンプリコンの保持を促すために、ジゴキシゲニン（「dig」）、ビオチンまたはイソチオシアン酸フルオレセイン（FITC）などの残基に対して結合したデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP）を含むdNTP類似体を、場合により、dNTP α Sと一緒に増幅生成物中に包含させることができる。更に別のdNTP類似体は、場合により、増幅生成物を検出するのに用いられるタグすなわち標識として役立つこともできる。digなどのdNTP類似体の包含は、それぞれの包含された標識残基が、アルカリ性ホスファターゼ（AP- α -dig）に結合した抗dig抗体に対して結合することによってシグナルを生じるので、増強されたシグナルを提供する利点を有する。増幅された標的配列は、概して、PCRアンプリコンよりも小さいので、このようなdNTP類似体の包含は、in situ SDAに特に好都合である。しかしなが

ら、SDAアンプリコンがPCRアンプリコンよりも概して小さいとしても、従来のin situ SDAに関係した漏出は in situ PCRによるよりも少ないことが観察された。in situ t SDAのより高い温度のために、アンプリコン漏出は、おそらくは in situ PCRで観察された水準まで増加するかもしれないと予想された。しかしながら、実際は、高温でのアンプリコン漏出の僅かな増加はありうるが、in situ t SDAでのアンプリコン漏出は in situ PCRで見られるよりもなお有意に少ない。

標的増幅後、生成されたアンプリコンは、特異的核酸配列の検出のための当該技術分野において知られている方法のいずれによっても検出することができる。例えば、増幅生成物は、in situ でまたは細胞からのアンプリコンの放出後に、オリゴヌクレオチド検出用プローブに対する特異的ハイブリダイゼーションによって検出することができる。検出用プローブは、検出可能な標識、すなわち、検出可能なシグナルを生じるかまたは生じるように製造されうる残基を含む短いオリゴヌクレオチドである。標識は、オリゴヌクレオチドプローブ中に、ニックト

ランスレーションによって、末端標識によってまたはプローブの化学合成の際に包含されうる。オリゴヌクレオチドプローブと一緒に用いるための多数の直接のおよび間接的に検出可能な標識が当該技術分野において知られている。直接的に検出可能な標識としては、検出可能にするのに更に反応を必要としない標識、例えば、放射性同位体、蛍光残基および色素がある。イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) などの蛍光標識および ^{32}P などの放射性同位体は、in situ 増幅された標的配列の直接検出用にプローブを標識する場合に用いるのに好ましい。間接的に検出可能な標識としては、検出可能にするのに更に別の試薬と反応させる必要がある標識、例えば、着色反応生成物を生成することができる酵素、ビオチン、アビジン、ジゴキシゲニン、抗原、ハプテンまたは蛍光色素がある。酵素標識からのシグナルは、概して、酵素と、その基質および着色酵素反応生成物を生じるのに必要な何等かの追加の試薬とを反応させることによって発生する。ビオチン (またはアビジン) 標識は、標識されたアビジン (または標識されたビオチン) または標識された抗ビオチン (または標識された抗アビジン) 抗体に対して結合することによって検出することができる。ジゴキシゲニンおよびハプテン

標識は、通常、標識された抗ジゴキシゲニン (抗dig) または抗ハプテン抗体に対して特異的に結合することによって検出される。酵素は、本発明において間接的に検出可能な標識として用いるのに好ましい。最も好ましいのは、アルカリ性ホスファターゼ (AP) であるが、それは安定であり且つ組織および細胞中で標識するのに広範囲に用いられてきたからである。APの存在は、基質との反応によって検出することができる。APの検出に好ましい基質は、Vector Red/Vector Blue (ベクター・ラブズ (Vector Labs), CA)、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) /ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) (シグマ・ケミカル・カンパニー (Sigma Chemical Company), セント・ルイス, MO) または Nuclear Fast Red (シグマ・ケミカル・カンパニー) である。Vector Red は、蛍光の利点を更に有し、従来の光学顕微鏡法によってかまたは蛍光顕微鏡法によって正のシグナルの可視化を可能にする。APとこれらの基

質との着色反応生成物を生じさせる方法は当該技術分野において知られている。

増幅された標的配列を検出用プローブに対するハイブリダイゼーションによって検出するために、細胞または組織を、一本鎖の増幅生成物に対するプローブの特異的ハイブリダイゼーションに適切な反応条件下で、標識されたプローブに対して暴露する。概して、検出用プローブは、それが、二つの増幅プライマーの結合部位間にあるアンプリコン中のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成するように選択されるであろう。しかしながら、検出用プローブは、増幅プライマーのどちらかと同様のヌクレオチド配列を有していてもよい。検出用プローブに対する *in situ* ハイブリダイゼーションによる検出に適切な方法は、J.B.ローレンス (Lawrence) ら (1989年, *Cell* 57,493-502)、J.B.ローレンスら (1990年, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87,5420-5424) によっておよび米国特許第4,888,278号明細書で記載されている。

或いは、増幅生成物は、ウォーカーら (1992b)、上記によって記載のように、*in situ* でまたはプライマー伸長による細胞からの放出後に検出することができる。プライマー伸長法では、検出可能な標識を含むオリゴヌクレオチドプライマーを増幅生成物に対してハイブリッド形成させ、そしてポリメラーゼを加えることによって伸長させる。検出のために、プライマーは、好ましくは、 ^{32}P または

蛍光標識を用いて5'末端に標識することができる。或いは、ハイブリッド形成したプライマーの伸長は、直接的にまたは間接的に検出可能な標識を含むdNTP類似体を包含することができる。例えば、プライマーの伸長は、dig誘導体dNTPを包含することができ、次に、それを、 $\text{AP}-\alpha\text{-dig}$ および適当なAP基質との反応によって伸長後に検出する。伸長されるプライマーは、増幅プライマーと同じであってよいかまたはそれは、増幅プライマーの結合部位間にあるアンプリコン中のヌクレオチド配列に対してハイブリッド形成する異なったプライマーであってよい。

検出可能な標識は、標的配列増幅の際に、アンプリコン中に直接的に包含させることもできる。例えば、従来のSDA反応におけるdNTPの一つは、直接的

にまたは間接的に検出可能な標識に対して結合したdNTPを含むdNTP類似体によって完全にまたは部分的に置き換えることができる。例えば、所望の標識に対して結合したdUTPは、SDA反応においてdTTPの代わりに置き換えることができる。次に、ポリメラーゼは、増幅プライマーの伸長によって生じた増幅生成物中に直接的に標識を包含する。その標識は、直接的にまたは間接的に検出することができる。好ましくは、dNTPに対して結合した標識は、蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーによってアンプリコン中で直接的に検出することができる蛍光標識である。

別の好ましい実施態様において、dNTPに対して結合した標識はビオチンまたはジゴキシゲニンであり、それは、ストレプトアビジン/FITCとの反応および蛍光顕微鏡法またはフローサイトメトリーによって検出することができる。

第二増幅生成物は、標的配列上のシグナルプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長によって生じた標的配列のコピーである。第二増幅生成物は、増幅された標的配列の内部セグメント、およびシグナルプライマーと結合している検出可能な標識を含む。少なくとも、シグナルプライマーの3'末端は、標的配列に対してハイブリッド形成する配列を含む。それは、更に、第二増幅生成物の捕捉または固定化を促進する特徴を含むことができるので、それらは、検出、定量または更に別の操作のために単離することができる。in situ SDA反応での第二増幅生成物の同時生成は、均一であり且つ増幅と同時に行うことができるも

う一つの検出法を提供する、極めて長い in situ プローブハイブリダイゼーション工程は排除され、そしてシグナルプライマーの濃度は、ハイブリダイゼーションプローブに対するよりも低い。より低い濃度自体がバックグラウンドを減少させ、そしてバックグラウンドを更に減少させるより高い緊縮洗浄をも可能にする。第二増幅生成物を生じるために、少なくとも一つのシグナルプライマーを in situ SDA反応混合物中に包含させる。そのシグナルプライマーは、増幅プライマーのハイブリダイゼーション部位の下流の標的配列に対してハイブリッド形成し、そして増幅プライマーの伸長に似た様式でポリメラーゼによって伸長される。増幅プライマーの伸長は、標的配列からシグナルプライマーの下流伸長

生成物を置換する。次に、反対側の増幅プライマーは、伸長され置換されたシグナルプライマーに対してハイブリッド形成することができ、そしてそれ自体がポリメラーゼによって伸長され、結果として、標的増幅を示す一層長い二重らせん中へのシグナルプライマーの包含をもたらす。残りの伸長されないシグナルプライマーはいずれも小さいので、それらは細胞外へ洗浄除去することができるが、伸長されたシグナルプライマーは細胞中に保持される。したがって、標的増幅特異的シグナルは、標的が存在している細胞と結合するようになり、そして標的が存在しない細胞にはほとんど存在しない。

次に、ハイブリッド形成した検出用プローブ、伸長されたプライマー、アンプリコンまたは第二増幅生成物の標識を、好ましくは、*in situ* で、増幅された標的配列の存在の指標として検出する。これは、AP、ビオチンまたは *dig* などの間接的に検出可能な標識のシグナルを生じるように、細胞に対する試薬の添加を必要とすることがありうる。細胞の顕微鏡分析は、検出可能な標識が酵素である場合に好ましい。顕微鏡分析は、細胞若しくは組織の目視観察（蛍光または光学顕微鏡法）によるかまたはDISCOVERY（ベクトン・ディキンソン・イメージ・サイトメトリー（Becton Dickinson Image Cytometry），ライデン，オランダ）などの装置を用いる自動映像分析によって、正の細胞の数およびシグナル強度を評価することができる。標識が放射性標識である場合、細胞をシンチレーション液中に懸濁させ、そしてシグナルをシンチレーション計数によって検出することができる。直接的に検出可能な蛍光標識の使用は、フローサイトメトリー（例え

ば、FACSCAN、ベクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリー・システムズ（Becton Dickinson Immunocytometry Systems），サン・ホセ，CA）による懸濁液中の細胞の蛍光分析を可能にする。細胞数対蛍光強度のプロット上でのピーク蛍光の右側への移動は、標的配列を含有する細胞数の増加を示すものである。逆に、プロット上でのピーク蛍光の左側への移動は、標的配列を含有する細胞数の減少を示すものである。或いは、増幅生成物は、上記のように検出前に細胞から放出されうるしまたは、例えば、EtBr染色、検出用プローブのハイブリダイゼーション若しくはプライマー伸長によってゲル電気泳動後に増幅生成物のバン

ドとして可視化されうる。放射性標識をプライマーまたは検出用プローブに対して用いる場合、増幅生成物は、ゲルのオートラジオグラフィーによって可視化されうる。

in situ 増幅およびフローサイトメトリーによる分析のための細胞を製造する慣用法は、抗体染色および／または増幅の前に、全血からの末梢血単核細胞（PBMC—例えば、FICOLL 勾配遠心分離）の単離を必要とする。PBMCからT細胞を単離する追加の工程もまた必要でありうる。このような慣用的なプロトコルは、全血試料に関するフローサイトメトリー結果を得るのに約2日間を要する。現在、全血試料を固定し且つ in situ 増幅させて、試料を調製するのに FACS™ 溶解液（ベクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリー・システムズ、サン・ホセ、カリフォルニア）を用いてたった一日でフローサイトメトリー分析することができることが判っている。この溶解試薬は、ジエチレングリコール、ヘパリン、クエン酸緩衝液およびホルムアルデヒドを含み、pH 7.2である。ホルムアルデヒドの存在のために、FACS™ 溶解液は、生物学的試料からの生物障害物を減少させる利点を提供する。新規な試料調製プロトコルでは、試料を FACS™ 溶解液によって簡単に溶解させた後、上記のように固定し、透過性にし、そして in situ 増幅させる。懸濁液中または組織中の細胞を in situ t SDA および免疫染色両方によって分析する場合、溶解および固定の前に抗体を目的のエピトープまたは抗原に対して結合させること、および抗体を間接的に検出可能な標識、例えば、ビオチンに対して結合させることが好ましい。次に、抗体結合体を、固定によって細胞上で安定化させる。in situ t SDA 後、結合した抗体を、適当

なシグナル発生試薬、例えば、蛍光色素に結合したストレプトアビジンまたは蛍光色素に結合した抗ビオチンとの反応によって検出する。標的増幅の検出のための蛍光色素および抗体の蛍光色素は、フローサイトメトリーで別々に検出可能であり、実施者は、細胞中の標的の存在を確認し且つ標的が見出される細胞の種類を識別することを同時にすることができる。新規な試料調製プロトコルは、増幅反応において蛍光標識されたシグナルプライマーの包含によって更に短縮するこ

とができる。上記のように、シグナルプライマーは、増幅反応の際に標的増幅特異の様式で伸長され且つ二本鎖にされて、増幅生成物を検出する追加の増幅後工程の必要性をなくする。

S D Aのための増幅プライマーの設計は、概して、目的の標的部分に対して向けられた多数のプライマーの合成に続いて、S D A反応においてプライマーの対の組合わせを試験してそれぞれの対の増幅効率を測定することを必要とする。これは、S D Aプライマー性能に影響を与えるパラメーターが十分に理解されていないことによる。本発明者は、S D Aのための増幅プライマーの標的結合部分の重要でないと思われる変化が、増幅効率に対して有意の且つ予想外の効果を有することがあるということ、およびその標的結合部分の融点は、プライミング効率に必ずしも関係していないということを発見した。in situ t S D Aの開発において、H I Vのg a g遺伝子に特異的な増幅プライマーの第一対を設計した。S D A制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含まないg a g遺伝子の標的部分を選択した。標的部分はまた、それぞれが約1 0 0 b p離れ且つ比較的不変である約5 0 b pの二つの部分を有することを基準として選択された。次に、プライマー設計ソフトウェアを用いて、それぞれのプライマー候補の標的結合の融点を決定し且つプライマーダイマーの形成の可能性を判断した。プライマーは、これらの予備的結果にしたがって修飾されるかまたは放棄された。8種類の候補「左側」増幅プライマー（第一鎖上の標的の3'末端に対して向けられた）および9種類の候補「右側」増幅プライマー（第二鎖上の標的の3'末端に対して向けられた）の最終リストを実験用にコンパイルした。バンパープライマーおよび検出用プローブは、融点および増幅プライマーに関して適当な配置だけを考慮して設計された。

「左側」および「右側」プライマーの対の組合わせの増幅効率は、in vitro t S D Aにおいてg a g標的、B c aポリメラーゼおよびB s o B Iのプラスミドクローンを用いて実験的に決定された。アンプリコンは、³²P標識検出用プローブのハイブリダイゼーションおよび伸長に続くゲル電気泳動によって検出され且つ定量された。in vitro で最もよい増幅効率の増幅プライマー対は、in situ

t S D Aで更に開発するために選択された。上記のように最適化された緩衝液システムにおいて、このプライマーセットは、in vitro t S D Aにおいて g a g 標的配列を10コピー未満検出した (B s o B I 部位をイタリック体で示し、標的結合配列に下線を施している)。

左側増幅プライマー (配列番号: 1)

ACCGCATCGAATGCATGTCCTCGGGTGGTAAAAGTAGTAGAAG T_M 41°C

右側増幅プライマー (配列番号: 2)

CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGGTGTTTAGCATGGTGTI T_M 55°C

バンパープライマー

AAATGGTACATCAGGCC T_M 57°C (配列番号: 3)

GCAGCTTCCTCATTGAT T_M 58°C (配列番号: 4)

検出用プローブ (配列番号: 5)

GGTGGCTCCTTCTGATAATG T_M 63°C

H L A - D Q α 遺伝子のエクソン 3 に特異的な 1 対の増幅プライマーを、in vitro での候補増幅プライマー対の評価のために、ヒト胎盤 D N A を用いて同様に設計した。H L A 遺伝子は全ての細胞中に存在するので、この標的は、in situ t S D A の正対照として用いられるはずであった。アンプリコンの漏出は重要な問題ではないことが判ったので、僅かながらより小さい標的部分を候補プライマーの初期識別用を選択した (約 75 ~ 100 b p)。3 種類の「左側」増幅プライマーおよび 3 種類の候補「右側」増幅プライマーを最初に設計し、そして対の組み合わせで実験的に試験した。上記のように最適化された緩衝液システムにおいて、以下のプライマーセットが最もよい増幅結果を与え、in vitro t S D A において H L A - D Q α エクソン 3 標的配列が 5 コピー未満検出された。

左側増幅プライマー (配列番号: 6)

ACCGCATCGAATGCATGTC7CGGGTGGTCAACATCACATGGC T_M 60°C

右側増幅プライマー (配列番号: 7)

CGATTCCGCTCCAGACTTC7CGGGTGAGAGGAAGCTGGTC T_M 53°C

パンパープライマー

GTCTTGTGGACAACATCTTTCC T_M 64°C (配列番号: 8)

TAACTGATCTTGAAGAAGGAATGATC T_M 59°C (配列番号: 9)

検出用プローブ (配列番号: 10)

AATGGGCACTCAGTCACAGA T_M 65°C

標的結合配列は、増幅プライマーに対して標的特異性を与える。本発明の増幅プライマーの標的結合配列は、したがって、S D A以外の核酸増幅プロトコル、例えば、P C Rおよび3 S Rにおいても有用である。具体的に、標的配列に対するプライマーの周期的特異的ハイブリダイゼーション、標的配列を鋳型として用いるプライマーの伸長および標的配列からの伸長生成物の置換を用いるいずれの増幅プロトコルも、本発明の増幅プライマーの標的結合配列を用いることができる。添付の配列表で示された増幅プライマーの制限エンドヌクレアーゼ認識部位などの特殊な非標的結合配列を全く必要としない増幅法 (例えば、P C R) に対して、増幅プライマーは、標的結合配列だけから成ることができる。配列表で示されたものとは異なった特殊な非標的結合配列を必要とする増幅法 (例えば、3 S R) は、挙げられた増幅プライマーの標的結合配列および当該技術分野において知られているような選択された増幅法によって必要とされる配列または構造を含む増幅プライマーを用いることができる。更に、t S D Aに適当な別の制限エンドヌクレアーゼ認識部位もまた、当該技術分野において知られている方法を用いて、配列表で示された制限エンドヌクレアーゼ認識部位の代わりに置き換えることができる。

以下の実験実施例を、本発明のいくつかの実施態様を例証するために与えるが、請求の範囲によって定義される発明を制限すると解釈されるべきではない。

実施例 1

H L A-D Q α エクソン 3 標的を、ヒト急性骨髄性白血病 (A M L) 細胞 (K G-1 a) において上記の選択されたプライマーセットを用いて in situ で増

幅させ且つ検出した。最初に、細胞を4%パラホルムアルデヒド中で30分間固定し、そして1Xリン酸緩衝溶液(PBS)中で3回洗浄した。次に、それらを0.01%サポニンによって20分間透過性にし、そして1X PBSによって3回洗浄した。固定され透過性にされた細胞(35mM K₂PO₄, pH 7.6中に細胞10⁸個/ml)5マイクロリットルを、35mM K₂PO₄, pH 7.6、3mM MgCl₂, それぞれ50μMのdGTP、TTPおよびdATP、1.4mM dCTPαS、500nM増幅プライマー、50nMバンパープライマー並びに15%グリセロールの40μLに対して加えた。静かに混合した後、試料を95℃で2分間インキュベートし、そして反応温度(52℃)で維持された THERMAL-LOKTM 温度ブロックに移した。次に、酵素混合物5マイクロリットルを加え(10NEB2 0.5μL、22単位/ml Bca 0.36μL、160単位/ml BsoBI 1.0μLおよび水3.14μL)且つ混合して増幅反応を開始した。最終反応容量は50μLであった。30分後、反応を氷上に置くことによって停止させ、そして増幅生成物を検出した。

放射性標識された検出用プローブ(2X10⁶cpm)を増幅反応に対して加え、そして増幅生成物に対して95℃で30分にかけて37℃で60分間 *in situ* でハイブリッド形成させた。1X SSC 200μL中で25分間2回洗浄した後、細胞をシンチレーション液中で計数した。1回のこのような実験の結果は以下の通りであった。

試験管 *in situ* ハイブリダイ

ゼーションシグナル

(cpm)

1	9510	<i>in situ</i> tSDA、特異的検出用プローブ
2	556	負の対照、特異的検出用プローブ
3	828	<i>in situ</i> tSDA、無関係の検出用プローブ
4	769	負の対照、無関係の検出用プローブ

試験管1において、増幅されたKG1a細胞は、HLA-DQαエクソン3特異的検出用プローブによって探査された。試験管2は、制限エンドヌクレアーゼ

が増幅反応から省かれた負の対照であり、t S D Aを妨げた。試験管3および4は試験管1および2に対応したが、標的配列とは無関係のg a g特異的検出用プローブによって探査された。必要な酵素全部の存在下で増幅され且つH L A-D Q α エクソン3特異的プローブによって検出された試料は全て、in situ で目的の標的の特異的増幅を示した。

増幅されていない細胞と in situ で生じたアンプリコンとのインキュベーションを含むように実験を繰返した。これは、アンプリコンの負の細胞への転移を、細胞表面に対するアンプリコンの付着によってかまたは負の細胞によるアンプリコンの取込みによって評価することであった。in situ 増幅後、反応を遠心分離して細胞を沈降させた。上澄みを70℃で15分間インキュベートしてB s o B I活性を除去し、そして予め95℃まで2分間加熱された固定され透過性にされたK G 1 a細胞に対して加えた。混合物を52℃で30分間インキュベートした後、細胞を上記のように、特異的および非特異的（無関係の）検出用プローブ両方を用いてハイブリッド形成させ、洗浄し、そして計数した。結果を以下に示す。

試験管 in situ ハイブリダイ

ゼーションシグナル

(cpm)

1	2924	負の対照、特異的プローブ
2	16284	in situ t S D A、特異的プローブ
3	17548	3 Xポリメラーゼ、特異的プローブ
4	5582	細胞インキュベーション、特異的プローブ
5	871	負の対照、無関係のプローブ
6	311	in situ t S D A、無関係のプローブ
7	501	3 Xポリメラーゼ、無関係のプローブ
8	453	細胞インキュベーション、無関係のプローブ

制限エンドヌクレアーゼは、試験管1の負の対照反応から省かれた。試験管2および3は、特異的検出によって完全な増幅反応を示した。試験管3は、試験管2の場合と同様であるが3倍のポリメラーゼ濃度増加を伴う条件下での in situ

t S D A から得られたシグナルを示す。試験管 4 では、in situ で生じた t S D A アンプリコンを、増幅されていない細胞と一緒にインキュベートした後、それを、増幅された試料の場合と同様にハイブリッド形成させ、洗浄し、そして検出した。試験管 4 には、試験管 2 の正シグナルがどれほど、増幅されていない細胞に対するアンプリコンの非特異的付着によるかを確認することが含まれた。試験管 5 ~ 8 は、無関係の g a g 検出用プローブを負の対照としてハイブリッド形成させたこと以外は試験管 1 ~ 4 の反応条件に対応する。前の実験の場合と同様に、標的の特異的 in situ 増幅は、明らかに、必要な酵素を全て含むそれらの試料中で起こり且つ特異的 H L A - D Q α エクソン 3 プローブによって検出された。上澄み中で見られることがあるアンプリコンが増幅されていない細胞によって取込まれる機序によって生じた偽陽性シグナル発生はある程度生じることがあるが、試験管 2 および 3 での実質的により高いシグナルは、明らかに、in situ S D A が起こっていることを示す。大部分のシグナルは標的の特異的であるが、アンプリコン転移のためではない。

別の検出システムにおいて、フルオレセインによって標識されたシグナルプライマーを用いて実験を繰返した。シグナルプライマーを増幅反応に対して 1 0 0 n M の濃度で加えた。それによって、蛍光プローブはポリメラーゼによって伸長し、そして上流の増幅プライマーの伸長によって標的から置換された。氷上で増幅反応を停止した後、試料をリン酸緩衝溶液 1 5 0 ~ 2 0 0 μ L によってそれぞれ 5 分間の洗浄によって洗浄した。より小さい伸長されていないシグナルプライマーが細胞から洗浄除去されたが、より長い標的増幅特異的蛍光シグナルプライマーは、増幅が起こった細胞によって保持された。これらの実験において、洗浄された細胞は蛍光顕微鏡法によって可視化され、その場合、強い蛍光シグナルは正の細胞で見られ、そして負の細胞は非蛍光であった。しかしながら、シグナルプライマー伸長は、フローサイトメトリーによる蛍光細胞の検出および/または計数にも適合する。

同様の実験系列の第三において、増幅生成物を比色検定で検出した。細胞を 4 % パラホルムアルデヒド中で 2 0 分間固定し、1 X P B S 中で 3 回洗浄し、そ

して0.01%サポニン中で10分間透過性にした。SDA緩衝液(35 mM KPO_4 pH 7.5、15%グリセロール、4 mM $MgOAc$)中で洗浄した後、細胞懸濁液(細胞 5×10^5 個) $5 \mu L$ を、上記のようなプライマーおよびdNTPを含むSDA緩衝液 $40 \mu L$ に対して加えた。前記のようなHLA-DQ α エクソン3プライマーセットを用い、標的変性後に酵素混合物 $5 \mu L$ を加えて標的を増幅させ、最終反応容量を $50 \mu L$ にした。ヒトHLAとマウスMHCとの間の相同性にもかかわらず、マウスMHC標的はこの増幅システムで増幅されないので、マウス細胞は負の細胞系として役立った。遺伝子配列データベースの分析は、ここで用いられたプライマーの結合部分におけるマウスとヒトとの間の相同性が不十分であることを示し、そして精製マウスDNAをPCRでこれらのプライマーを用いて増幅できないことによって負であることが確証された。94℃で2分間の変性後、ジゴキシゲニンで標識された検出用プローブ(1~10 nM)を33℃で2時間ハイブリッド形成させた。ハイブリダイゼーションに続いて、1X SSC中において室温で3回のハイブリダイゼーション後洗浄および100 mM トリス pH 7.5 / 150 mM NaClへの緩衝液交換を行った。次に、アルカリ性ホスファターゼ(AP)に結合した抗ジゴキシゲニン抗体(Fcフラグメント)を、細胞と一緒に室温で2~4時間インキュベートした。負の細胞から非結合抗体を除去するトリス/NaCl洗浄およびアルカリ性ホスファターゼ緩衝液(100 mM トリス pH 9.5 / 100 mM NaCl / 50 mM $MgCl_2$)への交換の後、NBT/BCIPを用いて、増幅が起こったそれらの細胞中で発色させた。細胞をスライド上に塗布し(cytospun)、そして顕微鏡法によって可視化した。ヒト細胞は、HLA-DQ α エクソン3検出用プローブを増幅した細胞中でハイブリッド形成させた場合に強い比色シグナルを生じた。増幅されていない細胞中でのHLA-DQ α エクソン3検出用プローブに対するハイブリダイゼーションは、負の、または極めて弱いはまだ明らかに負の比色応答を生じた。他の負の対照には、増幅の不存在(すなわち、SDA酵素無添加)、検出用プローブの不存在、および非特異的検出用プローブ(すなわち、増幅された細胞中のgagまたはニワトリ β -アクチン検出用プローブ)が

含まれ、それらはいずれも検定において負であった。マウス細胞単独では、HLA-DQ α エクソン3もgagプローブもほとんど色を生じなかったが、ヒトおよび

マウス細胞を増幅反応の際に混合した場合、マウス細胞中の比色シグナルが増加した。しかしながら、結果は、これが比色検出システム自体の人工物であること、および負の細胞は非特異的に色素を吸収していることを示唆する。

実施例 2

静脈血を、EDTA VACUTAINERTM採血管（ベクトン・ディキンソン・バクテイナー・システムズ (Becton Dickinson Vacutainer Systems)）に集めた。DNP結合抗CD4 (L120) およびビオチニル化抗CD3 (Leu4) 抗体を、全血50 μ Lに対して加え、そして室温で20分間染色した。赤血球を溶解させるために、1X FACSTM溶解液（ベクトン・ディキンソン・イムノサイトメトリー・システムズ）1.0mLを各管に対して10分間加えた。細胞を4%パラホルムアルデヒド中において室温で20分間固定し、そして1X FACSTM溶解液および0.025%トゥイーン20の0.5mLを加えることによって透過性にした。細胞を35mM KPO₄によって2回洗浄し、35mM KPO₄緩衝液5 μ L中に懸濁させ、そして0.5mLマイクロ遠心分離管に移した。

in situ tSDAに対して、35mM KPO₄、1.4mM dCTP α S、それぞれ200 μ MのdATP、dGTPおよびdTTP、4mM 酢酸Mg、15%グリセロール、0.05 μ Mの各バンパープライマー並びに0.05 μ Mの各増幅プライマーの40 μ Lを、調製された血液試料に対して加えた。試料を、95℃で3分間に続いて52℃～55℃で3分間加熱してプライマーをアニーリングした。プライマーアニーリング後、酵素配合物（10X NEB2緩衝液0.5 μ L、BsoBI 160単位、Bcaポリメラーゼ8単位）5 μ Lを加えて増幅反応を開始した。試験管を55℃で30分間インキュベートした。増幅生成物は、フルオレセインで標識された検出用プローブに対するハイブリダイゼーションによって in situ で検出された。ハイブリダイゼーションは、特異的または無関係の検出用プローブ100～150ngを含有するSDA反応緩衝

液25 μ L中において95℃で5分間に続いて33℃～37℃で60分間行われた。

或いは、増幅生成物は、増幅の際のフルオレセイン標識シグナルプライマーの包含によって検出された。この場合、増幅反応緩衝液には、特異的または無関係の5'フルオレセイン標識シグナルプライマー100 nMが更に含まれた。初期

加熱工程、酵素混合物の添加および増幅は、上記のように行われた。

検出用プローブの *in situ* ハイブリダイゼーション後、またはシグナルプライマーの存在下の t S D A の完了後に、細胞を1 X S S Cによって室温で30分間洗浄した。細胞表面マーカーの抗体染色は、抗D N P -フィコエリトリン (P E) およびC y 5 / P E 標識ストレプトアビジンによって展開された。細胞を1 X P B Sによって1回洗浄し、そしてフローサイトメトリー分析のために1 X P B S中に再懸濁させた。側方散乱対前方散乱 (S S C対F S C) のドットプロット上で、白血球は実験処理によって影響されないことが示された。すなわち、C D 4 / C D 3 免疫表現型の、(上記のプライマーセットを用いて) H L A -D Q α エクソン3 標的の *in situ* t S D A を施された細胞は、リンパ球、顆粒球および単球の典型的な集団を示した。リンパ球集団はまた、C D 4 対 C D 3 の蛍光ドットプロット上で正常に見えた。これらの実験は、FACS™ 溶解液および免疫表現型決定が両方とも *in situ* t S D A に適合することを実証した。

in situ t S D A によるH I V の検出のために、H I V ゲノムを含有する細胞系 (H 9 +) を正常な全血と混合し且つ上記のように処理し、そして上記の選択されたプライマーを用いてg a g 標的配列を増幅させた。更に、検出用プローブまたはシグナルプライマーとして用いることができる更に別のオリゴヌクレオチドを、配列番号: 5 に代わるものとして用いるために設計した。

AGCCACCCCACAAGATTT (配列番号: 11)

GTAATACCCATGTTTTTCAGCAT (配列番号: 12)

AAATCTTGTTGGGGTGGCT (配列番号: 13)

ATGCTGAAAACATGGGTATTAC (配列番号: 14)

S S C 対 F S C のドットプロット上で、H 9 + 細胞は、白血球集団のいずれよ

りも高い前方散乱を有するリンパ球、単球および顆粒球とは別の集団として明らかに区別できた。HLA-DQ α エクソン3およびHIV gag標的を、上記のプライマーセットを用いて *in situ* tSDAによって増幅させ、そしてシグナルプライマーの検出用プローブハイブリダイゼーションまたは包含によって検出した。FL1対細胞計数のヒストグラムプロットを図1で示す。HLA-DQ α エクソン3正対照は、酵素が加えられなかったまたは無関係のプローブ若しくは

シグナルプライマーが検出に用いられなかった負の対照反応と比較したところ、ピーク蛍光の右側への実質的な移動(約100チャンネル)を示した。HIV増幅反応は、FL1対細胞計数のヒストグラムプロット上で類似した蛍光ピーク移動を示した。これらの実験は、増幅が *in situ* で起こったことを確証し、しかも増幅されたHIV標的は溶解した全血中においてフローサイトメトリーによって検出することができたことを実証した。検出用プローブおよびシグナルプライマー検出法に関するピーク移動の大きさは類似していた。

或いは、静脈血を EDTA VACUTAINERTM 採血管に集め、そして FICOLL-PAQUETM による遠心分離によってPBMCを単離した。集めた細胞を1X PBSによって洗浄し、そしてヒトT細胞強化カラム(R&Dシステムズ)を用いて単球およびB細胞を除去した。T細胞の多い画分を、DNP結合抗CD4およびビオチニル化抗CD3抗体によって室温で20分間染色した。PBS中4%パラホルムアルデヒド中の20分間の固定後、細胞をPBSによって洗浄し且つ計数した。細胞を、サポニン10 μ g/mLによって透過性にし、そして35mM KPO₄によって2回洗浄した。細胞5 \times 10⁵個をKPO₄緩衝液5 μ L中に再懸濁させ、そして0.5mLマイクロ遠心分離管に移した。*in situ* tSDA、増幅生成物の検出および免疫表現型決定を、FACSTTM 溶解液試料調製法に関して上記に記載のように行った。実験結果は、二つの試料調製法に関してほぼ一致した。

配列表

(2) 配列番号：1の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：42塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖：1本
- (D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子種類：DNA (ゲノム)

(i x) 特色：

- (A) 名称／キー：種々の結合
- (B) 位置：25. . 42
- (D) その他の情報：／標準名＝「標的結合配列」

(i x) 特色：

- (A) 名称／キー：種々の特色
- (B) 位置：19. . 24
- (D) その他の情報：／標準名＝「制限エンドヌクレアーゼ認識部位」

(x) 配列種類：配列番号：1：

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGTGGTAA AAGTAGTAGA AG

42

(2) 配列番号：2の情報：

(i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：41塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖：1本
- (D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子種類：DNA (ゲノム)

(i x) 特色：

- (A) 名称／キー：種々の結合
- (B) 位置：25. . 41

(D) その他の情報：／標準名＝「標的結合配列」

(i x) 特色：

(A) 名称／キー：種々の特色

(B) 位置：19. . 24

(D) その他の情報：／標準名＝「制限エンドヌクレアーゼ認識部位」

(x) 配列種類：配列番号：2：

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGGTGTTT AGCATGGTGT T

41

(2) 配列番号：3の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：17塩基対

(B) 種類：核酸

(C) 鎖：1本

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子種類：DNA (ゲノム)

(x) 配列種類：配列番号：3：

AAATGGTACA TCAGGCC

17

(2) 配列番号：4の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：17塩基対

(B) 種類：核酸

(C) 鎖：1本

(D) トポロジー：直鎖状

(i i) 分子種類：DNA (ゲノム)

(x) 配列種類：配列番号：4：

GCAGCTTCCT CATTGAT

17

(2) 配列番号：5の情報：

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 20塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖: 1本

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種類: DNA (ゲノム)

(x) 配列種類: 配列番号: 5:

GGTGGCTCCT TCTGATAATG

20

(2) 配列番号: 6の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 42塩基対

(B) 種類: 核酸

(C) 鎖: 1本

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子種類: DNA (ゲノム)

(ix) 特色:

(A) 名称/キー: 種々の結合

(B) 位置: 25..42

(D) その他の情報: /標準名=「標的結合配列」

(ix) 特色:

(A) 名称/キー: 種々の特色

(B) 位置: 19..24

(D) その他の情報: /標準名=「制限エンドヌクレアーゼ認識部位」

(x) 配列種類: 配列番号: 6:

ACCGCATCGA ATGCATGTCT CGGGTGGTCA ACATCACATG GC

42

(2) 配列番号: 7の情報:

(i) 配列の特徴:

- (A) 長さ：40塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖：1本
- (D) トポロジー：直鎖状
- (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
- (i x) 特色：
 - (A) 名称／キー：種々の結合
 - (B) 位置：25. . 40
 - (D) その他の情報：／標準名＝「標的結合配列」
- (i x) 特色：
 - (A) 名称／キー：種々の特色
 - (B) 位置：19. . 24
 - (D) その他の情報：／標準名＝「制限エンドヌクレアーゼ認識部位」
- (x) 配列種類：配列番号：7：

CGATTCCGCT CCAGACTTCT CGGGTGAGAG GAAGCTGGTC

40

- (2) 配列番号：8の情報：
 - (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：22塩基対
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) トポロジー：直鎖状
 - (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
 - (x) 配列種類：配列番号：8：

GTCTTGTTGA CAACATCTTT CC

22

- (2) 配列番号：9の情報：
 - (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：26塩基対

- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖：1本
- (D) トポロジー：直鎖状
- (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
- (x) 配列種類：配列番号：9：

TAACTGATCT TGAAGAAGGA ATGATC

26

- (2) 配列番号：10の情報：
 - (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：20塩基対
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) トポロジー：直鎖状
 - (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
 - (x) 配列種類：配列番号：10：

AATGGGCACT CAGTCACAGA

20

- (2) 配列番号：11の情報：
 - (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：18塩基対
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) トポロジー：直鎖状
 - (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
 - (x) 配列種類：配列番号：11：

AGCCACCCCA CAAGATT

18

- (2) 配列番号：12の情報：
 - (i) 配列の特徴：

- (A) 長さ：22塩基対
- (B) 種類：核酸
- (C) 鎖：1本
- (D) トポロジー：直鎖状
- (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
- (x) 配列種類：配列番号：12：

GTAATACCCA TGTTTTTCAGC AT

22

(2) 配列番号：13の情報：

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：18塩基対
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
- (x) 配列種類：配列番号：13：

AAATCTTGTG GGGTGGCT

18

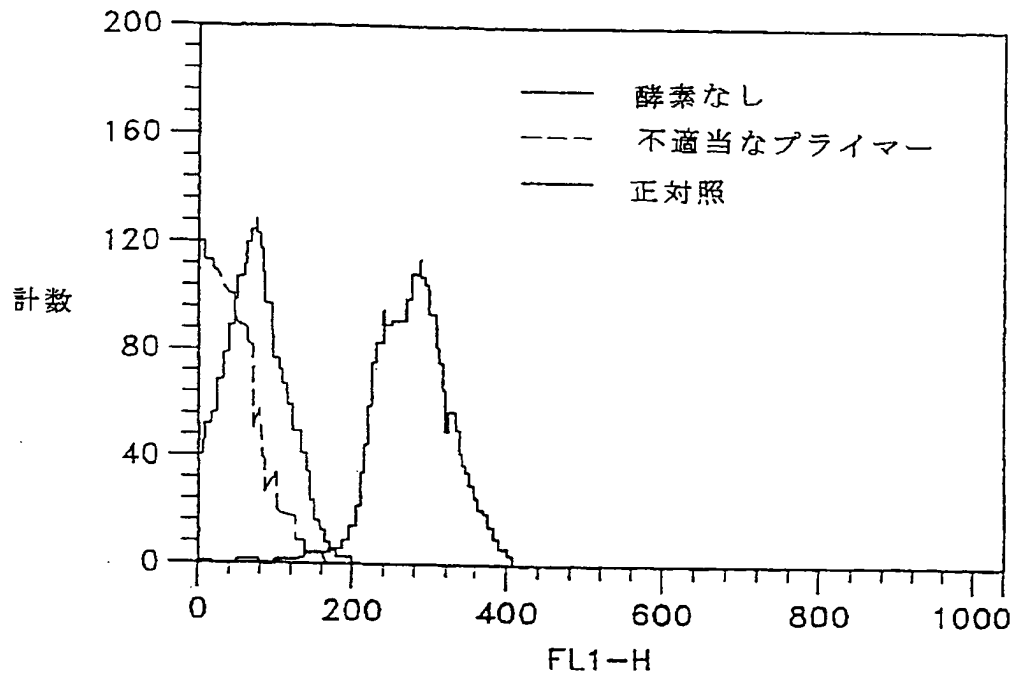
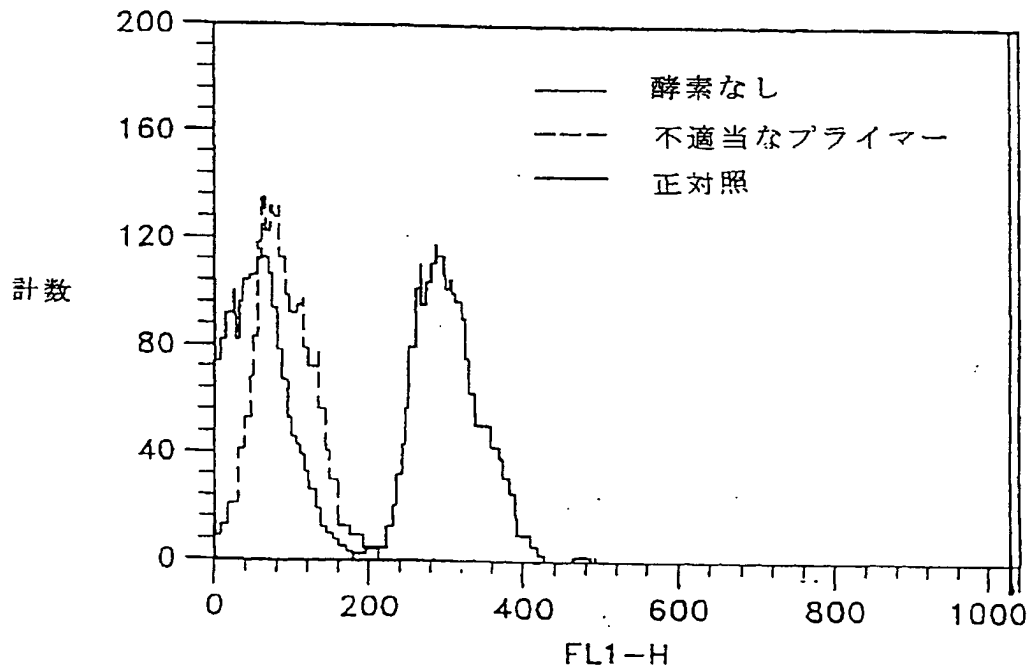
(2) 配列番号：14の情報：

- (i) 配列の特徴：
 - (A) 長さ：22塩基対
 - (B) 種類：核酸
 - (C) 鎖：1本
 - (D) トポロジー：直鎖状
- (i i) 分子種類：DNA (ゲノム)
- (x) 配列種類：配列番号：14：

ATGCTGAAAA CATGGGTATT AC

22

【図1】

FIG-1A HLA DNA 増幅FIG-1B HIV DNA 増幅

【手続補正書】

【提出日】 1997年6月2日

【補正内容】

(1) 請求の範囲を以下の通り補正する。

『1. 標的配列の *in situ* 増幅の方法であって、

(a) 細胞試料中において、第一増幅プライマーを標的配列の第一鎖に対して3'に *in situ* でハイブリッド形成させ、該第一増幅プライマーは、第一標的結合配列に対して5'に制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして第一外プライマーを該増幅プライマーの上流の標的配列の第一鎖に対してハイブリッド形成させ；

(b) 第一増幅プライマーおよび第一外プライマーを、

(i) 好熱性ポリメラーゼであって、約50℃～75℃で活性であり、鎖置換活性を有し、そして5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を欠いた上記好熱性ポリメラーゼ、

(ii) α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸、および

(iii) 好熱性制限エンドヌクレアーゼであって、その制限エンドヌクレアーゼ認識部位が該 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の包含によって半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼ認識部位にニックを入れる、約50℃～75℃で活性である上記好熱性制限エンドヌクレアーゼの存在下において伸長させ、それによって、制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含む第一増幅プライマー伸長生成物を生成し、そして第一外プライマーの伸長によって標的配列の第一鎖から第一増幅プライマー伸長生成物を置換し；

(c) 第一相補鎖を合成することによって第一増幅プライマー伸長生成物および制限エンドヌクレアーゼ認識部位を二本鎖にし、それによって、二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れ；

(d) ポリメラーゼを用いてニックから伸長させ、それによって標的配列のコピーを二本鎖第一増幅プライマー伸長生成物から置換し；

(e) 標的配列が *in situ* 増幅されるように、ニックング、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

2. 二本鎖制限エンドヌクレアーゼ認識部位に、AccI、BslI、BsmI、BsmAI、BsoBI、BsrI、BsrDI、BstNI、BstOI、BstXIまたはMwoIを用いてニックを入れる請求項1に記載の方法。

3. 好熱性ポリメラーゼが、exo~Vent、exo~DeepVent、Bst、exo~Pfu、Bcaおよび配列決定等級Taqから成る群より選択される請求項1に記載の方法。

4. 増幅した標的配列を、増幅中の標的配列上のシグナルプライマーのハイブリダイゼーションおよび伸長によって生じた第二増幅生成物によって検出する請求項1に記載の方法。

5. 二本鎖HIV gag 標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：1の標的結合配列を含む第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ、そして配列番号：2の標的結合配列を含む第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3'にハイブリッド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマーをポリメラーゼによって伸長させて、第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 第一および第二増幅プライマー伸長生成物を標的配列から置換し；そして

(d) 標的配列が増幅されるように、ハイブリッド形成、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

6. 第一および第二増幅プライマーがそれぞれ、 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の包含によって制限エンドヌクレアーゼ認識部位が半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れられる制限エンドヌクレアーゼの認識部位であって、標的結合配列に対して5'である制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして

(a) 外プライマーが、第一および第二増幅プライマーの上流の標的配列に対してハイブリッド形成し；そして

(b) 第一増幅プライマー、第二増幅プライマーおよび外プライマーが、制限

エンドヌクレアーゼおよび α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下において伸長して、外プライマーの伸長によって標的配列から置換される第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成する請求項5に記載の方法。

7. 二本鎖H L A-D Q α エクソン3 標的配列を増幅する方法であって、

(a) 配列番号：6の標的結合配列を含む第一増幅プライマーを該標的配列の第一鎖上の標的配列に対して3' にハイブリッド形成させ、そして配列番号：7の標的結合配列を含む第二増幅プライマーを該標的配列の第二鎖上の標的配列に対して3' にハイブリッド形成させ；

(b) 第一および第二増幅プライマーをポリメラーゼによって伸長させて、第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成し；

(c) 第一および第二増幅プライマー伸長生成物を標的配列から置換し；そして

(d) 標的配列が増幅されるように、ハイブリッド形成、伸長および置換の工程を繰返す工程を含む上記方法。

8. 第一および第二増幅プライマーがそれぞれ、 α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の包含によって制限エンドヌクレアーゼ認識部位が半修飾されている場合にその制限エンドヌクレアーゼによってニックを入れられる制限エンドヌクレアーゼの認識部位であって、標的結合配列に対して5' である制限エンドヌクレアーゼ認識部位を含み、そして

(a) 外プライマーが、第一および第二増幅プライマーの上流の標的配列に対してハイブリッド形成し；そして

(b) 第一増幅プライマー、第二増幅プライマーおよび外プライマーが、制限エンドヌクレアーゼおよび α -チオデオキシヌクレオシド三リン酸の存在下において伸長して、外プライマーの伸長によって標的配列から置換される第一および第二増幅プライマー伸長生成物を生成する請求項7に記載の方法。

9. 標的配列をポリメラーゼ連鎖反応で増幅させる請求項7に記載の方法。

10. 配列番号：1の標的結合配列、配列番号：2の標的結合配列、配列番号：6の標的結合配列または配列番号：7の標的結合配列を含むオリゴヌクレオチ

ト。』

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 95/14648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12Q1/68 C07H21/04 C12Q1/70		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 657 548 A (BECTON DICKINSON AND CO.) 14 June 1995 see the whole document ---	1-19
Y	ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 0, 21 May 1995, page 133 XP000613515 WRIGHT D ET AL: "thermophilic strand displacement amplification. A rapid method for amplification of DNA sequences to extreme high copy number" see whole abstract --- -/--	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 25 March 1997		Date of mailing of the international search report 0 8.04. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5118 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/US 96/14648

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ABSTRACTS OF THE GENERAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 95, no. 0, 21 May 1995, page 131 XP000613514 FRAISER M ET AL: "Single-genome detection of M. tuberculosis by thermophilic strand displacement amplification" see whole abstract ---	1-9
Y	EP 0 543 612 A (BECTON DICKINSON AND CO.) 26 May 1993 see the whole document ---	10-19
Y	EP 0 617 132 A (GEN PROBE INC) 28 September 1994 X especially SEQ ID No. 22 which overlaps 100% in 20 bp with Seq ID No. 5 of claims 14 and 20 ---	10-14 20
Y	WO 93 02215 A (ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF) 4 February 1993 X especially primer A, page 27 which shows an 100% identity in 17 bp to Seq ID Nos. 11 and 13 of claims 14 and 20 ---	10-14 20
Y	EP 0 459 533 A (CETUS CORP) 4 December 1991 see example 3 ---	15-19
A	EP 0 395 398 A (LIFE TECHNOLOGIES INC.) 31 October 1990 see page 5, line 3 ---	1
A	WO 95 25180 A (GEN-PROBE INCORP.) 21 September 1995 see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/14648

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item I of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item Z of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see continuation-sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 96/ 14648

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

1: A tSDA method for the in situ amplification of a target sequence in a sample of cells according to the subject matter of claims 1-9.

2: A tSDA method for amplifying HIV gag target sequences according to claims 10-14.

3: A tSDA method for amplifying HLA-DQalpha exon 3 sequences according to claims 15-20.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat'l Application No
 PCT/US 96/14648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 657548 A	14-06-95	US 5523204 A	04-06-96
		AU 8022194 A	15-06-95
		CA 2137760 A	11-06-95
		JP 8033500 A	06-02-96
EP 543612 A	26-05-93	US 5270184 A	14-12-93
		AU 662937 B	21-09-95
		AU 2849992 A	20-05-93
		CA 2082842 A	20-05-93
		JP 5276947 A	26-10-93
		JP 8000076 B	10-01-96
EP 0617132 A	28-09-94	AU 6551594 A	24-10-94
		JP 8508404 T	10-09-96
		WO 9423069 A	13-10-94
WO 9302215 A	04-02-93	NONE	
EP 0459533 A	04-12-91	EP 0459532 A	04-12-91
		AT 125307 T	15-08-95
		AU 594130 B	01-03-90
		AU 6996287 A	17-09-87
		CA 1284931 A	18-06-91
		DE 3751423 D	24-08-95
		DE 3751423 T	14-12-95
		DE 3777213 D	16-04-92
		EP 0237362 A	16-09-87
		HK 145894 A	30-12-94
		JP 7313197 A	05-12-95
		JP 62214355 A	21-09-87
		SG 132994 A	13-01-95
		US 5567809 A	22-10-96
		US 5541065 A	30-07-96
		US 5604099 A	18-02-97
		US 5468613 A	21-11-95
		US 5310893 A	10-05-94
EP 395398 A	31-10-90	US 5043272 A	27-08-91
		CA 2013800 A	27-10-90
		JP 2303489 A	17-12-90

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 96/14648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 395398 A		US 5106727 A	21-04-92
WO 9525180 A	21-09-95	AU 2101695 A	03-10-95
		EP 0676476 A	11-10-95

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, L
U, MC, NL, PT, SE), AU, BR, CA, J
P, KR, MX, SG

(72)発明者 バン・クリーブ, マーク
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州
27707, ダーラム, カリバー・パーク・ド
ライブ 7301, ナンバー202

(72)発明者 リード, ロバート・アラン
アメリカ合衆国ノース・カロライナ州
27713, ダーラム, リメリック・レイン
923

THIS PAGE BLANK (USPTO)